

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:
28. Juni 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/46460 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/04585

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Dezember 2000 (19.12.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 63 536.6 20. Dezember 1999 (20.12.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUT, Ivo, Glynne
[DE/FR]; 18 Rue du Moulin Vert, F-75014 Paris (FR).
BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532
Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119
Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING NUCLEIC ACID SEQUENCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for analyzing nucleic acid sequences by carrying out the following steps: a) hybridizing nucleic acid fragments on complementary sequences, which are immobilized on coded supports; b) hybridizing probes on the nucleic acid fragments that are hybridized in step a); c) sequentially identifying the coded supports and analyzing the probes bound thereto in a mass spectrometer; d) assigning the obtained mass information to the sequences of the utilized probes, and; e) matching the information obtained in such a manner with a database. The inventive method permits the analysis of DNA or RNA and, in particular, the coupling of a highly parallelizable sample preparation method with an analysis method having a high output.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben ist ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen, wobei man die folgenden Schritte ausführt: a) Hybridisierung von Nukleinsäurefragmenten an komplementäre Sequenzen, welche auf codierten Trägern immobilisiert sind; b) Hybridisierung von Sonden an die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente; c) sequentielle Identifikation der codierten Träger und Analyse der an diese gebundenen Sonden in einem Massenspektrometer; d) Zuordnung der erhaltenen Masseninformation zu den Sequenzen der verwendeten Sonden; e) Abgleich der so erhaltenen Informationen mit einer Datenbank. Das beschriebene Verfahren gestattet die Analyse von DNA oder RNA und insbesondere die Kopplung eines hochparallelisierbaren Probenaufbereitungsverfahrens mit einem Analyseverfahren mit hohem Durchsatz.

WO 01/46460 A2

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen. Das Gebiet der Erfindung ist die Analyse von DNA oder RNA und insbesondere die Kopplung eines hochparallelisierbaren Probenaufbereitungsverfahrens mit einem Analyseverfahren mit hohem Durchsatz.

Unbekannte DNA kann charakterisiert werden, indem sie sequenziert wird. Dies ist die präziseste Art DNA zu analysieren, jedoch ist die Sequenzierung auch sehr aufwendig. Nur sehr kurze DNA-Ausschnitte (<1000 Nukleobasen) können auf einmal sequenziert werden. Wenn DNA Fragmente, die größer als diese 1000 Nukleobasen lang sind, in größerem Umfang analysiert werden sollen, ist es notwendig die DNA zu unterteilen, was die Methode verteuert. Ein praktikableres Verfahren ist es, partielle Information über einen Array von verschiedenen Ziel-DNAs zu suchen. Ein Array mit vielen tausend Ziel-DNAs kann auf einer Festphase immobilisiert und anschließend alle Ziel-DNAs gemeinsam auf das Vorhandensein einer Sequenz mittels einer Sonde (Nukleinsäure mit komplementärer Sequenz) untersucht werden (Scholler, P., Karger, A.E., Meier-Ewert, S., Lehrach, H., Delius, H. and Hoheisel, J.D. 1995. Fine-mapping of shotgun template-libraries; an efficient strategy for the systematic sequencing of genomic DNA. Nucleic Acids Res. 23: 3842-3849). Eine Übereinstimmung in der Ziel-DNA mit der Sonde kommt durch eine Hybridisation der zwei Teile miteinander zustande. Sonden können beliebige Nukleinsäuresequenzen von beliebiger Länge sein. Es existieren verschiedene Verfahren für die Auswahl von optimalen Bibliotheken von Sondensequenzen, welche minimal miteinander überlappen. Sondensequenzen können auch gezielt zusammengestellt werden, um bestimmte Ziel-DNA Sequenzen aufzufinden. Oligofingerprinting ist ein Ansatz, bei welchem

diese Technologie zum Einsatz kommt. Eine Bibliothek von Ziel-DNAs wird mit kurzen Nukleinsäuresonden abgetastet. Meist sind hier die Sonden nur 8-12 Basen lang. Es wird jeweils eine Sonde auf einmal an eine auf einer Nylonmembran immobilisierte Ziel-DNA-Bibliothek hybridisiert. Die Sonde ist radioaktiv markiert und die Hybridisierung wird anhand der Lokalisierung der Radioaktivität beurteilt. Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind auch schon fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. (Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R. and Smith, L.M. 1994. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotides arrays of glass supports. Nucleic Acids Res. 22: 5456-5465).

Als Sonden kommen jegliche Moleküle in Frage, die sequenzspezifisch mit einer Ziel-DNA wechselwirken können. Am gängigsten sind Oligodeoxyribonukleotide. Jedoch bietet sich jede Modifikation von Nukleinsäuren an, z.B. Peptide Nucleic Acids (PNA), (Nielsen, P.E., Buchardt, O., Egholm, M. and Berg, R.H. 1993. Peptide nucleic acids. US Patent. 5,539,082; Buchardt, O., Egholm, M., Berg, R.H. and Nielsen, P.E. 1993. Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology. Trends in Biotechnology, 11: 384-386), Phosphorothioatoligonukleotide oder Methylphosphonatoligonukleotide. Die Spezifität einer Sonde ist sehr wesentlich. Peptide Nucleic Acids haben ein ungeladenes Rückgrat, welches gleichzeitig chemisch sehr stark von der gängigen Zucker-Phosphat Struktur des Rückgrats in Nukleinsäuren abweicht. Das Rückgrat einer PNA hat eine Amidsequenz anstelle des Zucker-Phosphat Rückgrats gewöhnlicher DNA. PNA hybridisiert sehr gut mit DNA komplementärer Sequenz. Die Schmelztemperatur eines PNA/DNA-Hybrids ist höher als die des entsprechenden DNA/DNA-Hybrids und die Abhängigkeit der Hybridisierung von Puffersalzen ist relativ gering.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analytmolekül wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyts erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

MALDI eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I.G. and Beck, S. 1995. DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Bioogy: Current Innovations and Future Trends. 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100-mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. Für MALDI spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA sind zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices gefunden worden, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, daß sie einem Peptid ähnlicher

- wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I.G. and Beck, S. 1995. A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 23: 1367-1373). Die Kopplung eines "charge tags" an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit in den gleichen Bereich wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von "charge tagging" ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren. PNAs und Methylphosphonatoligonukleotide sind mit MALDI untersucht worden und lassen sich so analysieren. Butler, J.M., Jiang-Baucom, P., Huang, M., Belgrader, P. and Girard, J. 1996. Peptide nucleic acid characterization by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 68: 3283-3287; Keough, T., Baker, T.R., Dobson, R.L.M., Lacey, M.P., Riley, T.A., Hasselfield, J.A. and Hesselberth, P.E. 1993. Antisense DNA oligonucleotides II: the use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the sequence verification of methylphosphonate oligodeoxyribonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7: 195-200; Ross, P.L., Lee, K. and Belgrader, P. 1997. Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 4197-4202).
- Kombinatorische Synthesen (Lowe, G. 1995. *Combinatorial Chemistry. Chem. Soc. Rev.* 24: 309), d.h. die Herstellung von Substanzbibliotheken ausgehend von einem Gemisch von Vorstufen, werden sowohl auf fester als auch in flüssiger Phase durchgeführt. Vor allem die kombinatorische Festphasensynthese hat sich frühzeitig etabliert, da in diesem Fall die Abtrennung von Nebenprodukten besonders ein-

fach ist. Nur die an den Support gebundenen Zielverbindungen werden in einem Waschschrift zurückbehalten und am Ende der Synthese durch das gezielte Spalten eines Linkers isoliert. Diese Technik erlaubt auf einfachem Wege die gleichzeitige Synthese einer Vielzahl verschiedener Verbindungen an einer Festphase und somit den Erhalt von chemisch "reinen" Substanzbibliotheken. Daher sind die Verbindungsklassen, die auch in nicht kombinatorischen, konventionellen Synthesen auf einer Festphase synthetisiert werden, der kombinatorischen Chemie besonders leicht zugänglich und werden demzufolge auch breit verwendet. Dies trifft vor allem auf Peptid-, Nukleinsäure- und PNA-Bibliotheken zu.

Die Synthese von Peptiden erfolgt durch Binden der ersten N-geschützten Aminosäure (z.B. Boc) an den Support, nachfolgende Entschützung und Reaktion der zweiten Aminosäure mit der freigewordenen NH_2 -Gruppe der ersten. Nicht reagierte Aminofunktionen werden in einem weiteren "Capping" Schritt einer Weiterreaktion im nächsten Syntheszyklus entzogen. Die Schutzgruppe an der Aminofunktion der zweiten Aminosäure wird entfernt und der nächste Baustein kann gekoppelt werden. Zur Synthese von Peptidbibliotheken wird ein Gemisch von Aminosäuren in einem oder mehreren Schritten verwendet. Die Synthese von PNA und PNA-Bibliotheken erfolgt sinngemäß. Nukleinsäure-Bibliotheken werden meist durch Festphasensynthese mit Gemischen verschiedener Phosphoramidit-Nucleoside erhalten. Dies kann auf kommerziell erhältlichen DNA-Synthesizern ohne Veränderungen in den Syntheseprotokollen durchgeführt werden.

Verschiedene Arbeiten zur kombinatorischen Synthese von PNA Bibliotheken sind publiziert worden. Diese Arbeiten behandeln den Aufbau von kombinatorischen Sequenzen, d.h. die Synthese von PNAs in denen einzelne, spezifische Ba-

sen in der Sequenz durch degenerierte Basen ersetzt werden und dadurch zufällige Sequenzvarianz erreicht wird. Die Verwendung massenspektrometrischer Methoden für die Analyse kombinatorischer Bibliotheken ist mehrfach beschrieben worden (z. B. Carr, S.A., Benkovic, S.J., Winograd, N. 1996. Evaluation of Mass Spectrometric Methods Applicable to the Direct Analysis of Non-Peptide Bead-Bound Combinatorial Libraries. Anal. Chem. 68: 237).

10 Es existieren verschiedene Verfahren um DNA zu immobilisieren. Das bekannteste Verfahren ist die Festbindung einer DNA, welche mit Biotin funktionalisiert ist, an eine Streptavidin-beschichtete Oberfläche (Uhlen, M. et al. 1988, Nucleic Acids Res. 16, 3025-3038). Die Bindungs-
15 stärke dieses Systems entspricht einer kovalenten chemischen Bindung ohne eine zu sein. Um eine Ziel-DNA kovalent an eine chemisch vorbereitete Oberfläche binden zu können, bedarf es einer entsprechenden Funktionalität der Ziel-DNA. DNA selbst besitzt keine Funktionalisierung,
20 die geeignet ist. Es gibt verschiedene Varianten in eine Ziel-DNA eine geeignete Funktionalisierung einzuführen: Zwei leicht zu handhabende Funktionalisierungen sind primäre, aliphatische Amine und Thiole. Solche Amine werden quantitativ mit N-Hydroxy-succinimidestern umgesetzt und
25 Thiole reagieren unter geeigneten Bedingungen quantitativ mit Alkyljodiden. Eine Schwierigkeit besteht im Einführen einer solchen Funktionalisierung in eine DNA. Die einfachste Variante ist die Einführung durch einen Primer einer PCR. Gezeigte Varianten benützen 5'-modifizierte
30 Primer (NH_2 und SH) und einen bifunktionalen Linker.

Ein wesentlicher Bestandteil der Immobilisierung auf einer Oberfläche ist ihre Beschaffenheit. Bis jetzt beschriebene Systeme sind hauptsächlich aus Silizium oder
35 Metall (magnetic beads). Eine weitere Methode zur Bindung einer Ziel-DNA basiert darauf, eine kurze Erkennungsse-

quenz (z.B. 20 Basen) in der Ziel-DNA zur Hybridisierung an ein oberflächenimmobilisiertes Oligonukleotid zu verwenden. Es sind auch enzymatische Varianten zur Einführung von chemisch aktivierten Positionen in eine Ziel-DNA beschrieben worden. Hier wird an einer Ziel-DNA enzymatisch eine 5'-NH₂-Funktionalisierung durchgeführt.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet sind für die Fluoreszenzmarkierung ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich auch einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulphit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basen-Paarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, daß Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekulare biologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder der Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese

Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt werden kann. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulphit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausende von möglichen Methylierungsereignissen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannte Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann auch dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

Die Bisulphit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Zeschnigk, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulphit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. and Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo, M. L. and Jones, P.A., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2529-2531) oder Enzymschnitt (Xiong, Z. and Laird, P.W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist

auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO99 28498).

5 Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. and Laird, P.W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M.L. and Jones, P.A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. and Clark, S. (1994), Bioessays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), 10 Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO 97/46705, WO 95/15373 und WO 97/45560.

15 Kodierte Partikel (Beads) finden schon seit einiger Zeit in sehr unterschiedlichen Gebieten ihre Anwendung. Farbkodierte Beads sind zur parallelen Diagnostik von T- und B-Zellen eingesetzt worden (Baran und Parker, Am. J. Clin. Pathol. 1985, 83, 182-9). Mit radioaktivem Indium versetzte Beads sind als Indikatoren der Motilität des 20 gastrointestalen Trakts verwendet worden (Dormehl et al Eur. J. Nucl. Med. 1985, 10, 283-5). Kürzlich sind zwei Firmen gegründet worden, die mit farbkodierten Kunststoffkügelchen hoch-parallele Diagnostik betreiben wollen (Luminex www.luminexcorp.com und Illumina 25 www.illumina.com). Diese Firmen verwenden 100 verschieden farbmarkierte Beads, an denen entsprechend viele verschiedene Sonden angebracht werden können. Dadurch können in einer Reaktion 100 verschiedene Parameter abgefragt werden, was z.B. 100 verschiedene diagnostische Tests 30 sein könnten (Chen J, Iannone MA, Li M-S, Taylor D, Rivers P, Nelsen AJ, Slentz-Kesler KA, Roses A, Weiner MP, „A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension“, Genome Research 10:549-557; Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li M-S, Rivers P, Slentz KA, Weiner MP, 35 „Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by

oligonucleotide ligation and flow cytometry", Cytometry 39:131-140; Healey BG, Matson RS, Walt DR, "Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutations", Analytical Chemistry 251:270-279).

5

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein Analyseverfahren zu schaffen, welches sich durch die Kopplung eines hoch parallelisierbaren Probenaufbereitungsverfahrens mit einem Analyseverfahren mit hohem Durchsatz auszeichnet.

10

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen geschaffen wird, wobei daß man die folgenden Schritte ausführt:

15

a) Hybridisierung von Nukleinsäurefragmenten an komplementäre Sequenzen, welche auf codierten Trägern immobilisiert sind;

b) Hybridisierung von Sonden an die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente;

20

c) sequentielle Identifikation der codierten Träger und Analyse der an diese gebundenen Sonden in einem Massenspektrometer;

d) Zuordnung der erhaltenen Masseninformation zu den Sequenzen der verwendeten Sonden;

e) Abgleich der so erhaltenen Informationen mit einer

25

Datenbank.

30

Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente DNA sind oder daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente RNA sind oder daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch die Polymerase Kettenreaktion erhältlich sind oder daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch Restriktionsverdau erhältlich sind oder daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch Behandlung mit ei-

35

ner reversen Transkriptase und anschließender Polymerase Kettenreaktion erhältlich sind.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden selbst Nukleinsäuren sind.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden PNA, Alkylphosphonat-DNA, Phosphorothioat-DNA oder alkylierte Phosphorothioat-DNA
10 sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist außerdem, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden entweder eine einzelne positive oder negative Nettoladung tragen oder daß die in Schritt b) verwendeten Sonden chemische Gruppen tragen, welche deren Molekülmasse verändern oder daß die in Schritt b) verwendeten Sonden abspaltbare Gruppen enthalten, welche über deren Masse identifizierbar sind.
15

20 Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, daß jede der in Schritt b) verwendeten Sondensequenzen über deren Sondenmasse identifizierbar ist. Bevorzugt ist ferner, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden durch kombinatorische Synthese erhältlich sind.

25 Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist auch bevorzugt, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Fluoreszenzfarbstoffe codiert sind oder daß die in Schritt a) verwendeten Träger über absorbierende Farbstoffe codiert sind oder daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Chemilumineszenz codiert sind oder daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Transponder codiert sind.
30

35 Bevorzugt ist ferner, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Nuklide codiert sind, welche mittels Elektrosenspinresonanz, Kernspinresonanz oder radioaktiven Zer-

fall nachweisbar sind oder daß die in Schritt a) verwendeten Träger über chemische Markierungen codiert sind, welche massenspektrometrisch nachweisbar sind.

5 Ferner ist erfindungsgemäß bevorzugt, daß man je Träger nur eine definierte Sequenz bindet. Wahlweise ist auch bevorzugt, daß man je Träger mehrere definierte Sequenzen bindet.

10 Bevorzugt ist aber auch, daß man an den Trägern zu den Primern aus der Amplifikation komplementäre Sequenzen bindet.

15 Bei einer erfindungsgemäßen Variante ist ferner bevorzugt, daß man die Schritte a) und b) gleichzeitig ausführt.

20 Außerdem ist bevorzugt, daß die in der Amplifikation verwendeten Primer Fluoreszenzmarkierungen tragen, die eine Vorauswahl der Träger vor der Analyse zulassen.

25 Besonders bevorzugt ist die erfindungsgemäße Variante des erfindungsgemäßen Verfahren, wobei man die Träger vor der Durchführung des Schrittes c) aufreiht, identifiziert und nacheinander einer Analyse zuführt.

30 Gleichfalls bevorzugt ist es, daß man die Träger vor der Durchführung des Schrittes c) derart auf eine Oberfläche verteilt, daß an vorbestimmten Orten jeweils nur ein Träger positioniert ist.

35 Das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt ferner, daß man die Sonden vor, bei oder nach der Einführung ins Massenspektrometer vom Träger löst.

Außerdem ist bevorzugt, daß man zur Desorption eine Matrix zugibt.

5 Besonders bevorzugt ist es, daß man die Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie durchführt.

10 In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, daß man die Analyse mittels ESI-Massenspektrometrie durchführt.

Bevorzugt ist es auch, daß man eine Ionenfalle in der massenspektrometrischen Analyse einsetzt.

15 Eine besonders bevorzugte Variante des Verfahrens ist es, daß die Identifikation des Trägers und die Analyse der hybridisierten Sonden in einem Verfahrensschritt erfolgen.

20 Ganz besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, daß man die in Schritt a) eingesetzte DNA zuvor mit Sulfit oder Disulfit oder einer anderen Chemikalie derart behandelt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.

30 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, enthaltend codierte Träger mit gebundenen DNA-Sequenzen und/oder Sonden sowie Information über die enthaltenden Sondensequenzen und deren Massen.

35 Beschrieben wird also ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen, das sich durch die Ausführung folgender Schritte kennzeichnet:

Im ersten Schritt werden beliebige Nukleinsäurefragmente an komplementäre Sequenzen, welche auf codierten Trägern immobilisiert sind, hybridisiert.

Die Nukleinsäurefragmente können dabei DNA und/oder RNA sein.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die hybridisierten DNA-Fragmente zuvor durch die Polymerase Kettenreaktion hergestellt. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens geht der Polymerase Kettenreaktion eine Behandlung von RNA mit einer reversen Transkriptase voraus.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden die hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch Restriktionsverdau hergestellt.

Die Codierung der Träger erfolgt bevorzugt über Fluoreszenzfarbstoffe und/oder über absorbierende Farbstoffe und/oder über Chemilumineszenz und/oder über Transponder und/oder über Elektronenspinresonanz und/oder über Kernspinresonanz und/oder radiaktiven Zerfall.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt die Codierung der Träger über chemische Markierungen, welche sich massenspektrometrisch nachweisen lassen.

An jeden Träger können spezifisch jeweils eine definierte Ziel-Sequenz oder auch mehrere unterschiedliche, definierte Ziel-Sequenzen gebunden werden. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind an den Trägern zu den Primern aus der Amplifikation komplementäre Sequenzen gebunden.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die eingesetzte DNA zuvor bevorzugt mit Sulfit oder Disulfit oder aber einer anderen Chemikalie derart behan-

delt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Diese Ausführung kann zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in DNA-Proben verwendet werden.

Im zweiten Verfahrensschritt wird eine Hybridisierung von Sonden an die im ersten Schritt hybridisierten Nukleinsäurefragmente durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens sind die verwendeten Sonden selbst DNA. In einer besonders bevorzugten Variante sind die Sonden PNA (Peptide Nucleic Acids) und/oder Alkylphosphonat-Oligonukleotide und/oder Phosphorothioat-DNA oder alkylierte Phosphorothioat-DNA oder Chimäre dieser Verbindungsklassen.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens tragen die verwendeten Sonden entweder eine positive oder negative einzelne Nettoladung. In einer weiteren bevorzugten Variante tragen die Sonden chemische Gruppen, die der Veränderung ihrer Molekülmasse dienen.

In einer weiteren bevorzugten Variante enthalten die verwendeten Sonden abspaltbare Gruppen, deren Masse wiederum zu ihrer Identifizierung genutzt werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführung des Verfahrens ist die Zusammensetzung einer Sondenbibliothek so gewählt, daß jede der verwendeten Sondensequenzen über die Sondenmasse eindeutig identifizierbar ist. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Sondenbibliotheken durch kombinatorische Synthese hergestellt.

In einer besonders bevorzugten Ausführung des Verfahrens werden der erste und zweite Schritt des Verfahrens gleichzeitig ausgeführt. In einer weiteren Variante wird
5 der zweite Verfahrensschritt vor dem ersten durchgeführt.

Im dritten Schritt des Verfahrens wird eine sequentielle Identifikation der codierten Träger und Analyse der an diesen gebundenen Sonden in einem Massenspektrometer
10 durchgeführt und in einem weiteren Schritt die erhaltene Masseninformation zu den Sequenzen der verwendeten Sonden zugeordnet. Zur Identifikation der Beads dient die oben erwähnte Codierung. Das Ablesen der Codierung kann vor,
15 während oder nach der Detektion der hybridisierten Sonden erfolgen.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensausführung tragen die in der Amplifikation verwendeten Primer Fluoreszenzmarkierungen, die eine Vorauswahl der Träger vor der
20 Analyse zulassen.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Träger vor der Analyse aufgereiht und nacheinander einer Analyse zugeführt. Alternativ können die Träger
25 vor der Analyse derart auf eine Oberfläche verteilt werden, daß an vorbestimmten Orten jeweils nur ein Träger positioniert wird.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Sonden vor, bei oder nach der Einführung ins Massenspektrometer vom jeweiligen Träger gelöst.
30

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie durchgeführt. Bevorzugt wird zur besseren Desorption im Massenspektrometer eine Matrix zugegeben. Alternativ kann
35

die Analyse mittels ESI-Massenspektrometrie durchgeführt werden. Bevorzugt ist ebenfalls die Verwendung einer Ionenfalle in der massenspektrometrischen Analyse.

- 5 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt die Identifikation des Trägers und die Analyse der hybridisierten Sonden in einem Verfahrensschritt.

- 10 Im letzten Schritt erfolgt ein Abgleich der Informationen mit einer Datenbank. Zuvor werden die Analyseergebnisse mit der Codierung der Beads assoziiert. Somit ist bekannt, welche Sondenmuster zu welcher Ausgangssequenz auf den Beads korrelieren.

- 15 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, der codierte Träger mit gebundenen DNA-Sequenzen und/oder Sonden und/oder Information über die enthaltenen Sondensequenzen und deren Massen enthält.

- 20 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Bindung von Oligonukleotiden an kodierte Partikel.

- 25 Die kodierten Partikel sind carboxylatbeschichtet. Die Carboxylatgruppen werden mit Acylisoharnstoff (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid) zur Aktivierung verestert. Anschliessend wird der Sulfo-NHS Ester gebildet. An diesen wird ein aminomodifiziertes Oligonukleotid gebunden. Das aminomodifizierte Oligonukleotid lässt sich auch unmittelbar an die mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid aktivierten
- 30 kodierten Partikel binden.

- 35 Beispiel 2

Codierung der Beads mit Massenlabeln

Die Beads werden wie oben beschrieben aktiviert und nachfolgend wird ein photolabiler Linker, wie auch aus der Peptidsynthese bekannt, gekoppelt. Nachfolgend wird das Oligomer, welches die Proben-DNA binden soll, sowie die zur Codierung verwendeten Moleküle, in diesem Fall Tripeptide mit charakteristischer Masse, an die Linker gekoppelt. Dabei kommt bekannte Peptidchemie zum Einsatz, wie sie auch unter anderem in der PNA-Synthese verwendet wird (HATU als Aktivator, alternativ EDC).

Beispiel 3

Hybridisierung der Proben

Das PCR-Produkt wird an 30mer Oligonukleotide, die an das Bead immobilisiert sind, hybridisiert, unter Bedingungen wie sie dem Fachmann geläufig sind ($T = 41^{\circ}\text{C}$, NH_4Cl 0,7 M, Citrat 0,07 M, -Larouylsarcosinat 3,6 %). Das PCR-Produkt wird auf an sich bekannte Art bevorzugt asymmetrisch hergestellt, in dem der Forward oder reverse-Primer in ca. 6fach höherer Konzentration eingesetzt wird. Nach der 1. Hybridisierung wird zunächst mit Puffer und dann sehr kurz mit aqua dest. nachgewaschen.

Beispiel 4

Hybridisierung der Sonden

Die Hybridisierung einer PNA-Sonde an die inzwischen an das Bead gebundene DNA-Probe erfolgt bei $T = 32^{\circ}\text{C}$ (11mer Sonde) in einem für diese Zwecke geeigneten Puffer, z.B. NH_4Cl 0,23 M, Citrat 0,023 M, Larouylsarcosinat 3,6 %. Nach der 2. Hybridisierung wird ebenfalls mit dem Hybridisierungspuffer und sehr kurz mit aqua dest. nachgewaschen.

Beispiel 5

Massenspektrometrische Identifikation der codierten Beads mit gleichzeitiger Analyse

5

Variante 1:

Die massencodierten Beads mit den hybridisierten Sonden werden in eine Mikrotiterplatte verteilt, pro Well bevorzugt ein Bead. Die Mikrotiterplatte wird nachfolgend mit einem wässrigen Puffer befüllt, im einfachsten Fall wird destilliertes Wasser verwendet. Die Mikrotiterplatte wird derart belichtet, dass es zu einer Spaltung des photolabilen Linkers kommt, entsprechend den Spezifikationen des Herstellers des Linkers, beispielsweise mit einer Hg-Hochdrucklampe. Die Lösung wird entweder unmittelbar in einem ESI-Massenspektrometer vermessen oder aber nach Vermischen mit einer Matrix (s.u.) auf einem MALDI-Probenträger eingetrocknet und nachfolgend vermessen.

20

Variante 2:

Die massencodierten Beads mit den hybridisierten Sonden werden zusammen mit einer Matrix direkt auf einen MALDI-Probenträger aufgebracht. Die Positionen der Beads auf dem Probenträger werden identifiziert und die hybridisierten Sonden sowie die Massencodierung in einem Schritt identifiziert. Dabei werden die photolabilen Linker durch das eingestrahlte Laserlicht gespalten und damit auch die Massencodierungen freigesetzt.

30

Beispiel 6

Analyse auf dem Massenspektrometer

Die Beads mit den an diese hybridisierten Sonden werden auf die Wells einer Mikrotiterplatte verteilt, wie auch

für kombinatorische Festphasensynthesen üblich, wobei jedes Well bevorzugt nur ein Bead enthalten soll. Die Wells werden mit einem Puffer zur Aufnahme der Sonden gefüllt, im einfachsten Fall kann destilliertes Wasser verwendet werden. Werden PNAs als Sonden eingesetzt, so hat sich die Verwendung von 0,1% TFA bewährt.

Die hybridisierten Sonden werden entweder thermisch oder mittels eines denaturierenden Reagenzes, wie z.B. 40% Formamid, von den Beads abgelöst. Nun werden die Lösungen direkt auf den Probenträger des Massenspektrometers aufgebracht. In diesem Beispiel wird ein Bruker Biflex Massenspektrometer mit Scout 384 Ionenquelle verwendet. Dadurch ist es möglich, dass die Lösungen aus einer 384er Mikrotiterplatte direkt mittels Pins übertragen werden können, da der Abstand der Wells in der Mikrotiterplatte dem Abstand der Proben auf dem Probenträger entspricht. Nachfolgend wird gleichermaßen die MALDI Matrix aufgetragen, wobei je nach Sonde unterschiedliche Varianten zum Einsatz kommen können. Für PNA Sonden hat sich beispielsweise eine 1%ige Lösung von alpha-Cyano-4-hydroxyzimtsäuremethylester und alpha-Cyano-4-methoxyzimtsäure im Verhältnis 1:1 bewährt.

Die Massen der Sonden werden wie dem Fachmann bekannt bestimmt und aus dem Muster auf die Sequenzen der an die Beads gebundenen DNA Fragmente geschlossen.

30

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen, dadurch gekennzeichnet, daß man die folgenden Schritte ausführt:
- 10 a) Hybridisierung von Nukleinsäurefragmenten an komplementäre Sequenzen, welche auf codierten Trägern immobilisiert sind;
- 15 b) Hybridisierung von Sonden an die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente;
- 20 c) sequentielle Identifikation der codierten Träger und Analyse der an diese gebundenen Sonden in einem Massenspektrometer;
- d) Zuordnung der erhaltenen Masseninformation zu den Sequenzen der verwendeten Sonden;
- e) Abgleich der so erhaltenen Informationen mit einer Datenbank.
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente DNA sind.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente RNA sind.
- 35 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch die Polymerase Kettenreaktion erhältlich sind.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch Restriktionsverdau erhältlich sind.
5
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente durch Behandlung mit einer reversen Transkriptase und anschließender Polymerase Kettenreaktion erhältlich sind.
10
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden selbst Nukleinsäuren sind.
15
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden PNA, Alkylphosphonat-DNA, Phosphorothioat-DNA oder alkylierte Phosphorothioat-DNA sind.
20
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden entweder eine einzelne positive oder negative Nettoladung tragen.
25
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden chemische Gruppen tragen, welche deren Molekülmasse verändern.
30
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden abspaltbare Gruppen enthalten, welche über deren Masse identifizierbar sind.
35

- 5 12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß jede der in Schritt b) verwendeten Sondensequenzen über deren Sondenmasse identifizierbar ist.
- 10 13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt b) verwendeten Sonden durch kombinatorische Synthese erhältlich sind.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Fluoreszenzfarbstoffe codiert sind.
- 20 15. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über absorbierende Farbstoffe codiert sind.
- 25 16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Chemiluminiszenz codiert sind.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Transponder codiert sind.
- 35 18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über Nuklide codiert sind, welche mittels Elektronenspinresonanz, Kernspinresonanz oder radioaktiven Zerfall nachweisbar sind.
19. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in Schritt a) verwendeten Träger über chemische Markierungen codiert sind, welche massenspektrometrisch nachweisbar sind.

20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man je Träger nur eine definierte Sequenz bindet.
- 5 21. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man je Träger mehrere definierte Sequenzen bindet.
- 10 22. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man an den Trägern zu den Primern aus der Amplifikation komplementäre Sequenzen bindet.
- 15 23. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte a) und b) gleichzeitig ausführt.
24. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Amplifikation verwendeten Primer Fluoreszenzmarkierungen tragen, die eine Vorauswahl der Träger vor der Analyse zulassen.
- 20 25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Träger vor der Durchführung des Schrittes c) aufreiht, identifiziert und nacheinander einer Analyse zuführt.
- 25 26. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Träger vor der Durchführung des Schrittes c) derart auf eine Oberfläche verteilt, daß an vorbestimmten Orten jeweils nur ein Träger positioniert ist.
- 30 27. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sonden vor, bei o-
- 35

der nach der Einführung ins Massenspektrometer vom Träger löst.

- 5 28. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Desorption eine Matrix zugibt.
- 10 29. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Analyse mittels MALDI-Massenspektrometrie durchführt.
- 15 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man die Analyse mittels ESI-Massenspektrometrie durchführt.
31. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß man eine Ionenfalle in der massenspektrometrischen Analyse einsetzt.
- 20 32. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifikation des Trägers und die Analyse der hybridisierten Sonden in einem Verfahrensschritt erfolgen.
- 25 33. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die in Schritt a) eingesetzte DNA zuvor mit Sulfit oder Disulfit oder einer anderen Chemikalie derart behandelt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen derart verändert werden, daß eine dem Basenpaarungsverhalten nach unterschiedliche Base entsteht, während die an der 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.
- 30

34. Kit, enthaltend codierte Träger mit gebundenen DNA-Sequenzen und/oder Sonden sowie Information über die enthaltenden Sondensequenzen und deren Massen.

This Page Blank (uspto)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Juni 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/46460 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/04585**

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Dezember 2000 (19.12.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 63 536.6 20. Dezember 1999 (20.12.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).**

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **GUT, Ivo, Glynne
[DE/FR]; 18 Rue du Moulin Vert, F-75014 Paris (FR).
BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532
Stahnsdorf (DE).**

(74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119
Berlin (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.**

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).**

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: **14. Februar 2002**

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: **METHOD FOR ANALYZING NUCLEIC ACID SEQUENCES**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR ANALYSE VON NUKLEINSÄURESEQUENZEN**

(57) Abstract: The invention relates to a method for analyzing nucleic acid sequences by carrying out the following steps: a) hybridizing nucleic acid fragments on complementary sequences, which are immobilized on coded supports; b) hybridizing probes on the nucleic acid fragments that are hybridized in step a); c) sequentially identifying the coded supports and analyzing the probes bound thereto in a mass spectrometer; d) assigning the obtained mass information to the sequences of the utilized probes, and; e) matching the information obtained in such a manner with a database. The inventive method permits the analysis of DNA or RNA and, in particular, the coupling of a highly parallelizable sample preparation method with an analysis method having a high output.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben ist ein Verfahren zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen, wobei man die folgenden Schritte ausführt: a) Hybridisierung von Nukleinsäurefragmenten an komplementäre Sequenzen, welche auf codierten Trägern immobilisiert sind; b) Hybridisierung von Sonden an die in Schritt a) hybridisierten Nukleinsäurefragmente; c) sequentielle Identifikation der codierten Träger und Analyse der an diese gebundenen Sonden in einem Massenspektrometer; d) Zuordnung der erhaltenen Masseninformation zu den Sequenzen der verwendeten Sonden; e) Abgleich der so erhaltenen Informationen mit einer Datenbank. Das beschriebene Verfahren gestattet die Analyse von DNA oder RNA und insbesondere die Kopplung eines hochparallelisierbaren Probenaufbereitungsverfahrens mit einem Analyseverfahren mit hohem Durchsatz.

WO 01/46460 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/DE 00/04585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 29897 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; BERLIN KURT (DE); GUT IVO GLYNNE (DE); LE) 17 June 1999 (1999-06-17) the whole document	1-34
Y	WO 98 31830 A (BRAX GENOMICS LTD ; THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUENTER (GB)) 23 July 1998 (1998-07-23) the whole document	1-34
Y	WO 97 37041 A (SEQUENOM INC) 9 October 1997 (1997-10-09) the whole document	1-34
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2001

Date of mailing of the international search report

27/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/DE 00/04585

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JIANG-BAUCOM P AND GIRARD J E: "DNA typing of human leukocyte antigen sequence polymorphisms by peptide nucleic acid probes and MALDI-TOF mass spectrometry" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, 1997, pages 4894-4898, XP002174822 the whole document</p>	<p>1-3,7-9, 12,19, 20, 27-29,34</p>
Y	<p>ROSS ET AL: "DISCRIMINATION OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN HUMAN DNA USING PEPTIDE NUCLEIC ACID PROBES DETECTED BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 69, no. 20, 15 October 1997 (1997-10-15), pages 4197-4202, XP002113518 ISSN: 0003-2700 cited in the application the whole document</p>	<p>1-3,7-9, 12,19, 20, 27-29,34</p>
Y	<p>OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 24, no. 24, 1996, pages 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 the whole document</p>	<p>1-4,6,7, 33</p>
A	<p>OLEJNIK J ET AL.: "Photorelease and MALDI analysis of oligonucleotides bound to solid surfaces through photocleavable biotin" BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 74, no. 2Pt2, February 1998 (1998-02), page A296 XP001015375 abstract</p>	
A	<p>BERLIN K ET AL: "ANALYSIS OF NEGATIVELY 'CHARGE TAGGED' DNA BY MATRIX-ASSISTED LASERDESORPTION/IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL FREQUENCY CONTROL SYMPOSIUM, PHILADELPHIA, MAY 1987, NEW YORK, IEEE, US, vol. SYMP. 41, 1987, pages 1739-1743, XP000971118 the whole document</p>	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/DE 00/04585

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUT I G ET AL: "DNA AND MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY" MOLECULAR BIOLOGY: CURRENT INNOVATIONS AND FUTURE TRENDS, HORIZON SCIENTIFIC PRESS, WYMONDHAM, GB, 1995, pages 147-157, XP000573516 cited in the application the whole document	
A	WO 96 32504 A (UNIV BOSTON) 17 October 1996 (1996-10-17) the whole document	
P,X	CHEN J ET AL: "A MICROSPHERE-BASED ASSAY FOR MULTIPLEXED SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ANALYSIS USING SINGLE BASE CHAIN EXTENSION" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 10, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 549-557, XP000927257 ISSN: 1088-9051 cited in the application the whole document	1-4,6,7, 14,20, 24-26,34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/04585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9929897 A	17-06-1999	EP 1038034 A	27-09-2000
WO 9831830 A	23-07-1998	AU 725966 B	26-10-2000
		AU 5570098 A	07-08-1998
		CN 1250483 T	12-04-2000
		EP 0979305 A	16-02-2000
		AU 1770499 A	12-07-1999
		EP 1042345 A	11-10-2000
		WO 9932501 A	01-07-1999
WO 9737041 A	09-10-1997	US 6194144 B	27-02-2001
		AU 2217597 A	22-10-1997
		US 6238871 B	29-05-2001
WO 9632504 A	17-10-1996	AU 5544696 A	30-10-1996
		CA 2218188 A	17-10-1996
		EP 0830460 A	25-03-1998
		JP 11503611 T	30-03-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04585

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 29897 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; BERLIN KURT (DE); GUT IVO GLYNNE (DE); LE) 17. Juni 1999 (1999-06-17) das ganze Dokument	1-34
Y	WO 98 31830 A (BRAX GENOMICS LTD ; THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUENTER (GB)) 23. Juli 1998 (1998-07-23) das ganze Dokument	1-34
Y	WO 97 37041 A (SEQUENOM INC) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) das ganze Dokument	1-34

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. August 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>JIANG-BAUCOM P AND GIRARD J E: "DNA typing of human leukocyte antigen sequence polymorphisms by peptide nucleic acid probes and MALDI-TOF mass spectrometry" ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd. 69, 1997, Seiten 4894-4898, XP002174822 das ganze Dokument</p>	1-3,7-9, 12,19, 20, 27-29,34
Y	<p>ROSS ET AL: "DISCRIMINATION OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN HUMAN DNA USING PEPTIDE NUCLEIC ACID PROBES DETECTED BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, Bd. 69, Nr. 20, 15. Oktober 1997 (1997-10-15), Seiten 4197-4202, XP002113518 ISSN: 0003-2700 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-3,7-9, 12,19, 20, 27-29,34
Y	<p>OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 24, Nr. 24, 1996, Seiten 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument</p>	1-4,6,7, 33
A	<p>OLEJNIK J ET AL.: "Photorelease and MALDI analysis of oligonucleotides bound to solid surfaces through photocleavable biotin" BIOPHYSICAL JOURNAL, Bd. 74, Nr. 2Pt2, Februar 1998 (1998-02), Seite A296 XP001015375 Zusammenfassung</p>	
A	<p>BERLIN K ET AL: "ANALYSIS OF NEGATIVELY 'CHARGE TAGGED' DNA BY MATRIX-ASSISTED LASERDESORPTION/IONIZATION TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL FREQUENCY CONTROL SYMPOSIUM. PHILADELPHIA, MAY 1987, NEW YORK, IEEE, US, Bd. SYMP. 41, 1987, Seiten 1739-1743, XP000971118 das ganze Dokument</p>	
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	GUT I G ET AL: "DNA AND MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION MASS SPECTROMETRY" MOLECULAR BIOLOGY: CURRENT INNOVATIONS AND FUTURE TRENDS, HORIZON SCIENTIFIC PRESS, WYMONDHAM, GB, 1995, Seiten 147-157, XP000573516 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
A	WO 96 32504 A (UNIV BOSTON) 17. Oktober 1996 (1996-10-17) das ganze Dokument	
P, X	CHEN J ET AL: "A MICROSPHERE-BASED ASSAY FOR MULTIPLEXED SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ANALYSIS USING SINGLE BASE CHAIN EXTENSION" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, Bd. 10, Nr. 4, April 2000 (2000-04), Seiten 549-557, XP000927257 ISSN: 1088-9051 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-4,6,7, 14,20, 24-26,34

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/04585

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9929897	A	17-06-1999	EP	1038034 A	27-09-2000
WO 9831830	A	23-07-1998	AU	725966 B	26-10-2000
			AU	5570098 A	07-08-1998
			CN	1250483 T	12-04-2000
			EP	0979305 A	16-02-2000
			AU	1770499 A	12-07-1999
			EP	1042345 A	11-10-2000
			WO	9932501 A	01-07-1999
WO 9737041	A	09-10-1997	US	6194144 B	27-02-2001
			AU	2217597 A	22-10-1997
			US	6238871 B	29-05-2001
WO 9632504	A	17-10-1996	AU	5544696 A	30-10-1996
			CA	2218188 A	17-10-1996
			EP	0830460 A	25-03-1998
			JP	11503611 T	30-03-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.